



Patentdirektoratet

Novo Industri A/S
Patent- og Varemærkeafdelingen
Novo Alle
2880 Bagsværd

Helgeshøj Allé 81
DK-2630 Taastrup

Telefon 02 71 71 71
Telefax 02 71 71 70
Telex 16046 DPO DK
Postgiro 4 020553

Vor ref: 4499/87-K2 bh/1
Deres ref: 3106.200-DK
Frist: 12 JAN. 1989

Dato: 12 JULI 1988

Indl.	3106.200	Land	DK
beh.	6	12 JULI 1988	IT
Akt		frist	890112

Betænkning

Efter modtagelsen af Deres skrivelse af 16 og 17 dec 1987 vedrørende patentansøgning nr. 4499/87 bemærkes følgende:

1. Vi mener, at den opfindelse, De søger patent på, er ny. Vi kan dog ikke godkende den nuværende beskrivelse med krav af de nedenfor anførte grunde.

2. Det fremgår af beskrivelsens side 3-4, at ikke alle stammer af Humicola danner lipaser, der kan anvendes som detergent-additiver, se f.eks. JP patentpublikation nr. 48-62990.

Det fremgår heraf, at stammen H. lanuginosa S-38 producerer lipaser, som har et pH optimum på ca. 8 og dermed ikke er anvendelig som detergentadditiv. I beskrivelsen er det kun sandsynliggjort, at lipaser fra de på side 5 omtalte stammer har overraskende god lipolytisk renseaktivitet ved de betingelser, der hersker i vaskeflotten.

De må derfor præcisere krav 1, jfr. de vedføjede bemærkninger, og krav 2 må udgå.

3. De må rette krav 3 og sætte det i relation til krav 1, f.eks. som vist, eller krav 3 må udgå.

4. Krav 7-10 og beskrivelsen indeholder nogle uklarheder, som vi beder Dem rette og tydeliggøre under hensyntagen til de vedføjede bemærkninger. Det bemærkes herunder, at beskrivelsen skal indledes på en upagineret forside med en kort og saglig benævnelse for opfindelsen, jfr. patentbestemmelsernes § 5. Opmærksomheden henledes på, at skrivelser til direktoratet med bilag bør affattes på dobbeltark, jfr. patentbestemmelsernes § 28. Deres skrivelse af 17 dec 1987 var således på enkeltark.

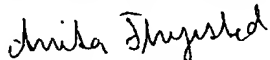
34 -

NZAS-0004265

De er velkommen til at indsende kommentarer, som skal indgå i den videre sagsbehandling. Hvis vi hverken modtager kommentarer eller nye bilag til ansøgningen inden udløbet af den frist, der er nævnt ovenfor, henlægger vi ansøgningen, dvs. vi indstiller behandlingen indtil videre.

Vi genoptager dog behandlingen, hvis vi inden 4 måneder efter at fristen er udløbet, modtager Deres kommentarer eller nye bilag og den fastsatte afgift på 500 kr. for genoptagelsen. Hører vi derimod stadigvæk ikke fra Dem, indstiller vi behandlingen endeligt.

Med venlig hilsen



Anita Thyrsled
akademilingenieur

BILAG: beskrivelse, krav, diverse fotokopier

Rapport over NYHEDSUNDERSØGELSEN I ANS. NR. 4499/87

- ☒ Fuldstændig undersøgt.
Obligatorisk, tilgængeligt materiale har været gennemgået i det omfang, der er angivet nedenfor (For så vidt angår senere indleverede ansøgninger med prioritet for nærværende ansøgnings indleveringsdag kan undersøgelsen først afsluttes 20 mdr. efter denne).

Nedenfor er under "Modhold" anført fremdraget materiale, der helt eller delvist foregriber opfindelsen. Under "Til orientering" er anført materiale med mere perifer tilknytning til opfindelsen, og hvoraf der ikke medfølger kopi.

- ☐ Ufuldstændig undersøgt.

Eventuelle yderligere bemærkninger:

- ☐ Obligatorisk materiale har ikke været gennemgået. Det fremdragne er tilvejebragt ved en ikke-systematisk undersøgelse.

Nyhedsundersøgelsen har omfattet:

Klasse(r)	grupper	DK	FI	NO	SE	DE	GB	FR	EP	WO	US
C 12 N	9/60, 9/14-9/20, 9/48-9/56	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
C 11 D	7/42, 3/386	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
C 12 D	13/10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
C 07 G	7/028	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
6 a	22/04	X	X	X	X	X					
6 a	22						X				
6 h	5, 5b						X	X			
3 ch	7 a						X				
195 :	53, 55, 56, 59, 12, 65, 66, 67										X
435 :	183, 195-198, 212, 219-223										X
23 e	2	X	-	X	X	X	X	X			
8 i	5	X	-	X	X	X	X	X			
8 rg	2						X	X			
252 :	89, 174.12										X

Modhold (kopieres i 1 ekspl.)	side	Til orientering (kopieres i 1 ekspl.)	side
✓ JP nr. 48-62990 (ikke prøvet)		US patent nr. 4011169 ✓ GB patent nr. 1293613 ✓ EP A1 1200642 (OK 2890/83 og OK 2999/84) ✓ ✓ Current Science, 50, nr. 15, s. 680-682, (1981) ✓ Agr. Biol. Chem., 37 (11), s. 2488, 1979	



Patentdirektoratet

Helgeshøj Allé 81
DK-2630 Taastrup

Dato og signatur

29/6 - 88 MT

NZAS-0004268

15 DEC. 1987

ans. nr. 7494/87

Opfindelsen angår et enzymatisk detergentadditiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, et detergent omfattende sådanne additiver og en vaskemetode, ved hvilken et sådan detergent anvendes.

- 5 Det område, som omfatter enzymatiske additiver i detergenter, har været i hastig vækst i de sidste årtier. Der kan f.eks. henvises til artiklen "How Enzymes Got into Detergents", bd. 12, Developments in Industrial Microbiology, en publikation fra Society for Industrial Microbiology, American
10 Institute of Biological Sciences, Washington D.C. 1971, af Claus Dambmann, Poul Holm, Villy Jensen og Mogens Hilmer Nielsen, og til P.N. Christensen, K. Thomsen og S. Branner: "Development of Detergent Enzymes", foredrag holdt den 9. oktober 1986 på "The 2nd World Conference on Detergents" i
15 Montreux, Schweiz.

Proteolytisk detergentadditiv anvendes i udstrakt grad i Europa, USA og Japan. I flere lande indeholder størstedelen af detergenterne, både flydende og i pulverform, protease.

- 20 Anvendelsen af lipase som et detergentadditiv er kendt. En omfattende oversigt findes i H. Andree et al.: "Lipases as Detergent Components", Journal of Applied Biochemistry, bind 2, 218-229 (1980). Flere eksempler findes i US patentskrift nr. 4,011,169 (spalte 4, linie 65 til spalte 5,
25 linie 68) i GB patentskrift nr. 1,293,613 (side 2, linie 6-29) og i et foredrag af T. Fujii med titlen "Washing of Oil Stains with Lipase" (på japansk), der blev holdt på det 16. Symposium on Washing, der blev afholdt i Tokyo den 17.-18. september 1984.

- 30 Blandt kendte lipaser, der er anvendt som detergentadditiver, har Fusarium oxysporum lipase så vidt vi ved de bedste lipolytiske egenskaber, betragtet ud fra et detergentanvendelsessynspunkt, jfr. vor europæiske patentansøgning med publikationsnummer 0 130 064, især sammenligningstabellen på
35 side 27.

Hvis vaskeprocessen gennemføres ved høj temperatur og høj alkalinitet, vil størstedelen af det fedtholdige snavs under alle omstændigheder blive fjernet. Vaskeprocesser ved lav eller middel temperatur (ca. 60°C og derunder) anvendes 5 dog nu sædvanligvis, og ved disse lave temperaturer er de kendte lipaser kun i stand til at opløse en del af det fedtholdige smuds.

Hidtil er effektiviteten af lipolytiske detergent-additiver sædvanligvis blevet målt ved hjælp af EMPA-lapper 10 (EMPA er en forkortelse for Eidgenössische Materialprüfungs- und Versuchsanstalt, St. Gallen, Schweiz) nr. 101 (olivenolie/bomuld) og 102 (olivenolie/uld) ved tillempling af den metode, der er beskrevet i engelsk patentskrift nr. 1.361.386 (især side 4 og 7) og US patentskrift nr. 3.723.250 (især 15 spalte 15-19). På denne måde kan den lipolytiske rensevirkning udtrykkes som forskellen i remissionsværdi ΔR . Imidlertid blev her anvendt to direkte mål for den lipolytiske rensevirkning. For det første blev mængden af restfedt bestemt. Derved vises den kombinerede virkning af detergent og lipase. For 20 det andet blev restfedtet analyseret for tilstedeværelsen af olie (triglycerid) og ned-brydningsprodukter (mono- og diglycerid og fedtsyre), og antallet af ikke-hydrolyserede glyceridbindinger i olien blev beregnet; dette viser lipasevirkningen mere direkte. Ved anvendelse af disse metoder har det 25 vist sig, at selv den bedst kendte detergentlipase udviser en lipolytisk vaskevirkning, som kunne ønskes forbedret.

Endvidere er det kendt, at lipaser, eftersom de er proteiner, har tendens til at blive angrebet af proteaser, og som tidligere nævnt indeholder mange detergenter i dag prote- 30 aser. Der er intet publiceret, som fortæller om detergentlipaser, der har tilfredsstillende stabilitet i tilstedeværelsen af protease. Tværtimod har det vist sig, at nogle kendte detergentlipaser har ringe stabilitet i detergentopløsninger i tilstedeværelsen af almindeligt anvendte deter- 35 gentproteaser.

Der er således behov for et lipolytisk detergent-additiv, der udviser en betydeligt bedre lipolytisk detergent-virkning ved økonomisk rimelige lipaseaktiviteter i vaske-flotten, og som er stabil i detergentopløsninger, der inde-
5 holder detergentprotease.

Det første aspekt ved opfindelsen tilvejebringer et lipolytisk detergentadditiv, der er kendetegnet ved, at lipa-sen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten Humi-cola, inklusive slægten Thermomyces.

10 Ved et andet aspekt tilvejebringer opfindelsen et lipolytisk detergentadditiv, der er kendetegnet ved, at lipa-sen krydsreagerer immunologisk med lipasen fra Humicola lanu-ginosa stamme DSM 3819.

Andre aspekter ved opfindelsen tilvejebringer et
15 detergent omfattende ovennævnte lipolytiske detergentadditiv og en vaskemetode, der anvender dette detergent ved pH 7-12.

Detergentlipaserne ifølge opfindelsen udviser en vaskevirkning, der er langt bedre sammenlignet med tidligere kendte detergentlipaser. Endvidere er de lipaser, som er
20 anvendt i opfindelsen, stabile i detergentopløsning i til-stedeværelsen af almindeligt anvendte detergentproteaser, mod-sat kendte detergentlipaser.

Det er beskrevet i japansk patentpublikation nr. 48-62990 (ikke prøvet), at Humicola lanuginosa er en lipase-
25 producent. Imidlertid nævnes det ikke i denne japanske patent-ansøgning, at Humicola lanuginosa lipasen er velegnet som aktiv komponent i et enzymatisk detergentadditiv. Tværtimod fremgår det af fig. 1 i den japanske patentansøgning, at Humi-cola lanuginosa lipasens pH optimum ligger på ca. 8, og at
30 aktiviteten falder hurtigt når pH-værdien stiger til over 8. Det måtte således forventes, at denne lipase ville være uegnet som detergentadditiv, da pH i vaskeflotter sædvanligvis er langt over 8. Det har dog overraskende vist sig, at Humicola lanuginosa lipasen har et pH optimum langt over 8, se eksempel
35 1 senere i denne beskrivelse.

Det er endvidere beskrevet i Current Science, aug. 5, 1981, bind 50, nr. 15, s. 680, at *Humicola lanuginosa* lipasen kan anvendes til kemisk rensning. Da pH optimummet, der udelukkende vedrører vandige medier, er helt uden betydning 5 for en lipase til kemisk rensning, betyder ovenstående redegørelse intet for egnetheden af *Humicola lanuginosa* lipasen som et lipolytisk detergentadditiv.

Desuden ses det af Agr.Biol.Chem. 37 (11), side 2488 (1973), at *H. lanuginosa* lipasen hæmmes meget ved tilsætning 10 af visse anioniske overfladeaktive stoffer. Ifølge vore opdagelser er *H. lanuginosa* lipasen dog overraskende fortrinligt kompatibel med LAS, der er et almindeligt anvendt anionisk overfladeaktivt stof.

Lipaseproducerende mikroorganismer

15 Lipaser ifølge opfindelsen opnås fortrinsvis fra stammer af termofil *Humicola* sp., inklusive termophil *Thermomyces* sp., såsom *H. lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce, *H. stellata* Bunce, *H. grisea* var. *thermoidea*, Cooney & Emerson, *H. insolens*, Cooney & Emerson, *Thermomyces ibadanensis*, Apinis & 20 Eggins, *H. hyalothermophila* Moubasher, Mazen og Abdel-Hafez, *H. grisea* var. *indica* Subrahmanyam, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar og *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske 25 detergentadditiv ifølge opfindelsen kan lipasen fremstilles fra *H. lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Bunce, *H. brevispora* Subrahmanyam og Thirumalachar, *H. brevis* var. *thermoidea* Subrahmanyam og Thirumalachar eller *H. insolens* Cooney & Emerson.

H. lanuginosa er endvidere beskrevet under synonymerne 30 *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky, *Sepedonium lanuginosum* Griffon og Maublanc, *Sepedonium thermophilum cyclosporum* og *S. thermophilum ovosporum* Velich, *Acremoniella* sp. Rege, *Acremoniella thermophila* Curzi og *Monotospora lanuginosa* (Griffon og Maublanc) Mason.

Ydermere blev arten Scytalidium thermophilum (Cooney & Emerson) Austwich af Hedger (1975, "The Ecology of thermophilic Fungi in Indonesia", i "Biodegradation et Humification", "Rapport du ler colloque International" - Nancy 1974 (ed. G. Kilbertius, 5 O. Reisinger, A. Mourey & J. A. Cancela Da Fonseca), Sarreguemines: Pierron Editeur - 57206) anset for at tilhøre Humicola insolens.

I en særligt foretrukket udførelsesform kan lipasen fremstilles af en af følgende stammer:

10 taxonomisk			
<u>benævnelse</u>	<u>internt Nr.</u>	<u>deponeringsnr.</u>	<u>deponerings-</u> <u>dato</u>
H. lanuginosa	A 1231	DSM 3819	13. aug 1986
H. lanuginosa	H 126	DSM 4109	4. maj 1987
H. brevispora	A 2121	DSM 4110	4. maj 1987
15 H. brevis var. thermoidea	A 2106	DSM 4111	4. maj 1987
H. insolens	C 579	DSM 1800	1. okt 1981

DSM står for Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. Stammerne er deponeret under Budapesttraktatens bestemmelser.

20 Lipase til brug i opfindelsen kan fremstilles ved aerob dyrkning af en af ovenstående stammer i henhold til de i teknikken kendte retningslinier, f.eks. som de senere angivne eksempler.

Immunokemisk karakterisering af lipaser

25 Det må forstås, at lipaser, der er fremstillet ved genetisk teknik på basis af Humicola sp., og som har aktive centre, der er identiske med aktive centre af de lipaser, der kan fremstilles fra Humicola sp. også omfattes af opfindelsen. De foretrukne lipaser ifølge opfindelsen krydsreagerer immuno-

30 gisk med (er "antigenisk" identisk eller delvis "antigenisk" identisk med) en lipase fra Humicola sp., især med lipasen fra

en af de ovenfor angivne arter, specielt *H. lanuginosa* og særligt fra en af de ovenfor angivne stammer, især DSM 3819 og DSM 4109.

Prøve for identitet (krydsreaktion) kan udføres ved 5 den velkendte Ouchterlony dobbelt immunodiffusionsmetode eller ved tandem krydset immunoelektrophorese i henhold til N. H. Axelsen: Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques (Blackwell Scientific Publication, 1983), kapitel 5 og 14. Begreberne "antigenisk identitet" og "delvis antigenisk iden- 10 titet" er beskrevet i samme bog, kapitel 5, 19 og 20.

Ved at anvende monospecifik antiserum fra kanin, rejst imod oprenset lipase fra DSM 4109, viste det sig, at lipaserne fra stammerne DSM 3819, 4109, DSM 4110 og DSM 4111 alle var antigenisk identiske ved begge ovennævnte metoder. 15 Fremstilling af antiserum er beskrevet i N.H. Axelsens bog, kapitel 41. Oprensningen af lipase er beskrevet i W-H Liu, Agr.Biol.Chem., bind 37(1), s. 157-163 (1973); Det viste sig dog, at søjlekromatografi lidt nemmere kan udføres ved at anvende: DEAE-sepharose (anionbytterkromatografi), phenylsepha- 20 rose (hydrofob interaktionskromatografi), efterfulgt af gel-filtrering på TSK G3000SW.

Enzymkemisk karakterisering af lipase

pH-afhængigheden af aktiviteten blev bestemt ved en traditionel metode, hvor tributyrin blev anvendt som substrat 25 ved 30°C i en pH-stat og med gummi arabicum som emulgeringsmiddel. Aktiviteten ved forskellige pH-værdier blev fundet udfra forbruget af alkali overfor tid.

pH-afhængigheden blev også checket med et mere realistisk substrat, nemlig olivenolie, der var adsorberet på PVC 30 (i henhold til US patentskrift 4,284,719).

pH-aktivitetskurverne for lipase fra *H. lanuginosa* DSM 3819 fremgår af fig. 1 (tributyrin) og fig. 2 (olivenolie/PVC). Kurverne for DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 var tilsvarende, idet de viste optimum ved pH 10,0 - 10,5 ved

begge metoder. pH-aktivitetskurverne for lipase fra H. insolens DSM 1800 fremgår af fig. 3 (tributyrim) og fig. 4 (olivenolie/PVC):

Isoelektrisk fokusering blev udført på de fem lipaser, hvorefter et lag med tributyrim blev lagt ovenpå for at påvise lipaseaktiviteten. Det viste sig, at DSM 3819, DSM 4109, DSM 4110 og DSM 4111 alle har lipaseaktiviteter med pI omkring 4,5, mens DSM 1800 har størstedelen af dets lipaseaktivitet med pI omkring 9,0 - 9,5 og kun en ubetydelig mængde lipaseaktivitet med pI omkring 4,5.

Detergentadditive

Ved en foretrukket udførelsesform tilvejebringes det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen som et ikke-støvende granulat eller som en væske. Disse er egnede til anvendelse i henholdsvis pulverdetergenter og flydende detergenter. Granulater kan fremstilles på flere forskellige måder. Der kan henvises til britisk patentskrift nr. 1,362,365, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvendelse som detergentadditiver ved hjælp af et apparat omfattende en ekstruder og en sfæronisator (solgt som MAMUMERIZER®), og til US patentskrift nr. 4,106,991, som beskriver fremstillingen af enzymholdigt granulat til anvendelse som detergentadditiver ved hjælp af en tromlegranulator.

Hvad angår en flydende formulering har lagerstabiliteten en tendens til at være utilstrækkelig, og en væske med et enzymstabiliseringsmiddel er derfor foretrukket. Stabiliseringsmidler kan være propylenglycol eller andre midler, der er kendt som stabiliseringsmidler til enzymopløsninger. Som det fremgår senere i denne beskrivelse har en ren vandig opløsning af lipasen ifølge opfindelsen en ringe lagerstabilitet, men den kan forbedres betydeligt ved at inkludere stabiliseringsmidler, f.eks. propylenglycol.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er lipaseaktiviteten over ca. 10.000 LU/g additiv. Lipaseenhed (LU) bliver defineret senere i denne beskrivelse. På denne måde dannes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, når deter-

gentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,1 til 5,0 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte.

I en særligt foretrukket udførelsesform indeholder 5 det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen andre detergentenzymer udover lipasen, såsom protease, amylase eller cellulase. Alkaliske Bacillus-proteaser er foretrukket på grund af deres velkendte virkning som detergentproteaser. Som sådanne enzymer kan det proteolytiske enzym ALCALASE® fra Novo 10 Industri A/S, fremstillet mikrobielt ved dyrkning af Bacillus licheniformis, eller de proteolytiske enzymer SAVINASE® og ESPERASE®, også fra Novo Industri A/S, fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 3,723,250, anvendes. Det blandede enzymatiske additiv kan fremstilles enten ved at blande et 15 tidligere fremstillet granulat af proteinase med et tidligere fremstillet granulat af lipase, eller ved at blande et koncentrat af proteinase med et koncentrat af lipase og derefter indføre blandingen i et granuleringsapparat, sammen med de sædvanlige granuleringshjælpemidler.

20 Nutildags er protease en almindelig detergentbestanddel, og som det vil fremgå senere, er lipaser ifølge opfindelsen i udstrakt grad kompatible i detergentopløsninger med vigtige detergentproteaser, såsom de ovenfor angivne. Hvis både lipase og protease skal tilsættes til et detergent kan 25 det være passende at anvende dem i form af et blandet additiv.

I en særligt foretrukket udførelsesform for det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen er den proteolytiske aktivitet mellem ca. 0,5 og ca. 3,0 Ansonenheder/g additiv. På denne måde tilvejebringes en passende proteolytisk 30 aktivitet i vaskeflotten når detergentadditivet tilsættes til detergentet i en mængde af 0,2 - 2 g/100 g detergent, og når detergentet tilsættes til vaskeflotten i en mængde af 0,5 - 20 g detergent/l vaskeflotte. Den velkendte Anson hemoglobin-metode for proteolytisk aktivitet er beskrevet i Journal of 35 General Physiology, 22, 79-89 (1959).

Detergent

I overensstemmelse med den tidligere nævnte udførelsesform for additivet ifølge opfindelsen kan detergentet ifølge opfindelsen være et pulver eller et flydende detergent, 5 og kan om ønsket omfatte andre detergentenzymer, såsom protease, amylase eller cellulase, enten i det samme additiv eller som separate additiver.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergentet ifølge opfindelsen indeholder detergentet det enzymatiske detergentadditiv ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,1 og 5% w/w, mere fortrinsvis i en mængde af 0,2 - 2% w/w. På denne måde tilvejebringes en passende balance mellem 10 enzymvirkningen og virkningen af andre detergentbestanddele.

Detergentet anvendes typisk i koncentrationer på 0,5 15 - 20 g/l vaskeflotte, og passende lipaseaktivitet i vaskeflotten er 1.000 - 10.000 LU/l, mere fortrinsvis 1.000 - 5.000 LU/l. Således er lipaseaktiviteten i detergentet i en foretrukket udførelsesform 50 - 20.000 LU/g, fortrinsvis 50 - 10.000 LU/g, mere fortrinsvis 250 - 2.000 LU/g og mest for- 20 trinsvis 500 - 2.000 LU/g detergent.

Som ovenfor nævnt er den foretrukne lipase i additivet over 10.000 LU/g, og denne tilsættes til detergenterne i mængder af fortrinsvis 0,1 - 5% w/w og mere fortrinsvis 0,2 - 2% w/w. Følgelig er lipaseaktiviteten i detergenterne ifølge 25 en anden foretrukket udførelsesform 10 - 500 LU/g, mere fortrinsvis 20 - 200 LU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform omfatter detergentet ifølge opfindelsen andre detergentenzymer foruden lipasen, mest fortrinsvis en protease. Foretrukne detergent- 30 proteaser er de, der allerede er nævnt. Lipase og protease kan tilsættes til detergentet enten separat eller i form af et blandet additiv. Som allerede nævnt anvendes proteaser almindeligvis i detergenter, og lipaser ifølge opfindelsen udviser en bemærkelsesværdig stabilitet i detergentopløsning med de 35 kommercielt vigtige proteaser. I overensstemmelse med ovennævnte foretrukne værdier for proteaseaktivitet foretrækkes en

proteaseaktivitet i detergentet på 0,0005 - 0,15 AU/g, mere fortrinsvis 0,001 - 0,060 AU/g, endnu mere fortrinsvis 0,003 - 0,025 AU/g og mest fortrinsvis 0,006 - 0,010 AU/g detergent.

I en særligt foretrukket udførelsesform for detergentet ifølge opfindelsen omfatter det overfladeaktive materiale 30-100% anionisk og 0-70% ikke-ionisk overfladeaktivt stof, mest fortrinsvis 50-100% anionisk og 0-50% ikke-ionisk overfladeaktivt stof. Vaskevirkning af lipase ifølge opfindelsen er særlig udtalt i detergenter med et højt indhold af anioniske midler, såsom LAS (lineær alkylbenzensulfonat).

I en særligt foretrukket udførelsesform i vaskeprocessen ifølge opfindelsen indeholder vaskeflotten detergentet ifølge opfindelsen i en mængde af mellem 0,5 og 20 g/l vaskeflotte. På denne måde tilvejebringes en passende lipaseaktivitet i vaskeflotten, nemlig typisk mellem 1.000 og 10.000 LU/l vaskeflotte, fortrinsvis mellem 1.000 og 5.000 LU/l vaskeflotte.

Fig. 1 - 4 viser pH-aktivitetskurverne, fig. 1 - 2 er for DSM 3819 lipase, og fig. 3 - 4 for DSM 1800 lipase. Fig. 1 og 3 er ved tributyrinmetoden, og fig. 2 og 4 ved olivenolie/PVC-metoden.

ERSEMPLER

Lipaseaktivitet

Fremgangsmåden er baseret på hydrolyse af tributyrin i en pH-stat. 1 LU (Lipase Unit - lipaseenhed) er mængden af enzym, som frigør 1 μ mol titrerbar smørsyre pr. minut ved 30°C, pH 7.0 med gummi arabicum som et emulgeringsmiddel. Yderligere detaljer gives i Novo Analytical Method AF 95/5, som efter anmodning kan rekvireres.

EKSEMPEL 1Lipase fra *H. lanuginosa* DSM 3819

Fyrre 500 ml rystekolber hver med 200 ml PL-lc medium (sammensætning følger) blev hver podet med 0,2 ml af en opslemning af sporer, fremstillet ud fra skrårør med *H. lanuginosa* DSM 3819, voksende på YPG-agar (sammensætning følger) i 5 dage ved 45°C. De således podede rystekolber blev rystet i 3 dage ved 45°C med en hastighed på 240 omdrejninger pr. minut. På dette tidspunkt var lipaseaktiviteten i den opsamlede væske (6,7 liter) 104 LU/ml. Cellerne blev fjernet ved centrifugering ved en hastighed på 4000 omdrejninger pr. minut i 25 minutter. Derved fik man 5,9 liter supernatant. Supernatanten blev filtreret gennem et 10 µ nylonfilterstof og derefter koncentreret 8 gange ved ultrafiltrering på Pellicon UF Cassette system (membraner med en nominel molekylvægtsgrense på 10.000).

UF-koncentratet (endeligt volumen på 740 ml) blev omdannet til råpulver ved frysetørring. Dette råpulver udviste en lipaseaktivitet på 13.310 LU/g.

Sammensætningen af YPG-agar var som følger:

20	Gærekstrakt, Difco	4	g/l
	Glucose	15	g/l
	K ₂ HPO ₄	1	g/l
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5	g/l
	Agar	20	g/l
25	Autoklaving ved 121°C i 40 minutter		

Sammensætningen af PL-lc medium var som følger:

	Pepton	15	g/l
	Tween-80	18	g/l
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	2	g/l
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1	g/l
5	Nalco-10	2	g/l
	pH før autoklaving	6,0	
	Autoklaving ved 121°C i 40 minutter		

EKSEMPEL 2Lipase fra andre Humicola-stammer

- 10 Stamme DSM 4111 blev gæret på medium PL-1c, stamme DSM 4109 på medium GT, stamme DSM 4110 på medium GTS-1, og Stamme DSM 1800 på medium LR-8ST, hovedsageligt som beskrevet i eksempel 1.

		Sammensætning af gæringsmedium			
		GT	GTS-1	LR-8ST	
15	Gærekstrakt (65% tørstof)	g/l	22,5	15	0
20	Pharmamedia	-	0	0	50
	Tween 80	-	18	5	5
	Span 80	-	0	5	5
25	MgSO ₄ , 7H ₂ O	-	2	2	0,5
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	-	0,1	0,1	0
30	K ₂ HPO ₄	-	0	0	5
	NaNO ₃	-	0	0	1
	Nalco-10	-	5	2	0
35	pH før autoklaving		~ 6,5	~ 6,0	~ 7,0

Udvinding fra kulturvæskerne blev hovedsageligt udført som beskrevet for DSM 3819 i eksempel 1. I tilfældet med lipase fra DSM 4109 blev et ekstra oprensningstrin udført forud for frysetørring, idet UF-concentratet blev udfældet med acetone, hvorefter det udfældede blev opløst igen i vand og frysetørret. De endelige frysetørrede pulvere udviste følgende lipaseaktiviteter:

Stamme	DSM 4111	DSM 4109	DSM 4110	DSM 1800
LU/g	32.000	211.000	6.600	1.800

10 Vaskemetode

Det prøvemateriale, der blev anvendt i vaskeforsøg, var bomuldsstof (med en overfladevægt svarende til ca. 1,2 g/50 cm²) imprægneret med olivenolie (Sigma 0-1500). Lapperne blev fremstillet ved at påføre 50 eller 85 µl (som angivet)

15 olivenolie, opvarmet til 50-60°C, i midten af hver prøvelap (7 x 7 cm) ved hjælp af en mikropipette. Efter oliepåføringen blev lapperne ældet ved stuetemperatur i 2 dage.

Lipasepræparaterne fra eksempel 1 og 2 blev anvendt og identificeret ved stammenumrene.

20 Til sammenligning anvendtes endvidere i dette eksempel et lipolytisk pulver på basis af *Fusarium oxysporum*, fremkommet som beskrevet i eksempel 23 i europæisk patentansøgning med publikationsnummer 0 130 064, som repræsenterende det mest effektive kendte lipolytiske detergentadditiv. *Fusarium oxy-*
 25 *sporum* lipasepræparatets aktivitet var 90.000 LU/g.

Lipaserne blev bedømt ved vaskeforsøg i en Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskine. Terg-O-Tometer forsøgsvaskemaskinen er beskrevet hos Jay C. Harris, Detergency evaluation and testing, Interscience Publishers Ltd., 1954, side 60 - 61.

30 Vaskeforsøgene udførtes under følgende betingelser:

	Omrøring	100 omdrejninger pr. minut
	Vandets hårdhedsgrad	18°dH (fra hanen), hvis andet ikke er angivet
	stof/væske forhold	7 lapper/1000 ml
5	skylning	15 min under løbende hane

Mængden af olie, der var indeholdt i 7 lapper med 85 µl hver er ca. 535 mg (vægtfylde 0,90).

Efter skylning blev lapperne lufttørret. Restindholdet af olie i lapperne blev bestemt ved Soxhlet ekstraktion med n-hexan i 5 timer efterfulgt af gravimetrisk bestemmelse af restmængden.

Sammensætningen af restolien blev analyseret ved hjælp af TLC-FID (TLC-FID er en forkortelse af "thin layer chromatography/flame ionization detector", og fremgangsmåden er beskrevet i Lipids, vol. 18, nr. 10 (1983), side 732) metoden, hvor der anvendes en Iatroscan TH-10 (Iatron Lab. Inc., Tokyo) kombineret med en Chromatocorder II (System Instruments Co., Ltd., Tokyo) integrator ved følgende betingelser:

	fast fase	Chromarod S-II (Iatron)
20	mobil fase	Hexan/ethylæter/eddikesyre (60:50:2 v/v/v)
	hydrogentilførsel	160 ml/min
	lufttilførsel	2000 ml/min
	scanningshastighed	30 sek. pr. scanning

Prøver til TLC-FID analysen blev fremstillet som følger. Efter gravimetrisk bestemmelse af restmængden blev det tørrede ekstrakt opløst igen i 20 ml hexan, og 5 ml intern standard (lithocholsyre, 12,5 mg/ml) opløst i ethanol blev tilsat. Til hver analyse brugtes 1 µl af prøven.

Baseret på standardkurver for triolein, diolein, monoolein og oliesyre blev restoliens relative sammensætning (% w/w) beregnet.

Antallet af uhydrolyserede glyceridbindinger i restolien blev beregnet ved følgende formel:

$$n = 10 \times M \left(885 \times X_{TG} + 621 \times X_{DG} + 357 \times X_{MG} \right) \quad (\mu \text{ mol})$$

hvor X_{TG} = procent triglycerid (% w/w)

X_{DG} = procent diglycerid (% w/w)

5 X_{MG} = procent monoglycerid (% w/w)

M = restmængden af olie (mg)

885, 621 og 357 er molekylvægten for henholdsvis triolein, diolein og monolein.

EKSEMPEL 3

10 Virkningen af vasketemperatur

Dette eksempel demonstrerer virkningen af *Humicola lanuginosa* lipasen (DSM 3819) i et anionisk detergent ved forskellige vasketemperaturer.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)
 15 Vasketid: 20 minutter
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 pH: 9,5
 Besmudsning: 85 μl olivenolie

LAS er lineær alkylbenzensulfonat (Nansa HS80/S, Albright & 20 Wilson), et anionisk overfladeaktivt stof.

Temp.		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
	Restolie (mg)	185	187	165
30°C	n (μ mole)	590	571	360
25	Restolie (mg)	187	192	157
50°C	n (μ mol)	606	628	432

EKSEMPEL 4Virkning af vasketid

I dette eksempel vises virkningen af *Humicola lanuginosa* lipasen (DSM 3819) ved at anvende forskellige vasketider.

5 Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Temperatur: 30°C
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

10 Vasketid (min.)		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
20	Restolie (mg)	185	187	165
	n (µ mol)	590	571	360
40	Restolie (mg)	177	167	128
	n (µ mol)	568	526	246
60	Restolie (mg)	141	147	93
	n (µ mol)	465	454	153
90	Restolie (mg)	139	135	78
	n (µ mol)	431	419	111

20 EKSEMPEL 5Virkning af vandets hårdhedsgrad ved vask

Dette eksempel viser indflydelsen af vandets hårdhedsgrad på vaskevirkningen af *Humicola lanuginosa* lipase (DSM 3819). Hårdhedsgraden (°dH = tysk hårdhed) blev indstillet ved
 25 at blande vand fra hanen med destilleret vand.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Temperatur: 30°C
 Vasketid: 20 minutter
 Lipasedosering: 3000 LU/l
 5 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

	Hårdhedsgrad °dH		Uden lipase	Fusarium oxysporum	Humicola lanuginosa
10	0	Restolie (mg)	254	244	242
		n (µ mol)	820	752	627
	6	Restolie (mg)	210	192	173
		n (µ mol)	670	595	415
	12	Restolie (mg)	182	179	170
		n (µ mol)	579	548	405
15	18	Restolie (mg)	185	187	165
		n (µ mol)	590	571	360

EKSEMPEL 6

Virkning af lipasedosering ved vask

Dette eksempel viser, hvilken betydning dosering af H.
 20 lanuginosa lipase har ved vaskeudførelser under anvendelse af
 acetonefraktioneret lipasepulver fra DSM 3819.

Detergentsammensætning: LAS (0,5 g/l), Na₂CO₃ (1,0 g/l)
 Vasketid: 20 minutter
 Temperatur: 30°C
 25 pH (initial): 9,5
 Besmudsning: 85 µl olivenolie

De besmudsede lapper, der anvendtes, var fra en anden
 portion end i eksemplerne 2 - 5, så resultaterne kan ikke sam-
 menlignes direkte.

<u>Lipasedosering, LU/ml</u>	0	500	1500	3000	6000	10,000
Restolie (mg)	232	209	202	202	194	176
n (μ mol)	761	558	521	471	437	363

EKSEMPEL 7**5 Sammenligning af Humicola lipaser ved vask**

Dette eksempel sammenligner den vaskevirkning, der blev opnået med lipase fra *H. lanuginosa* (DSM 4109), *H. brevis* var. *thermoidea* (DSM 4111), *H. brevispora* (DSM 4110) og *H. insolens* (DSM 1800).

10	Detergentsammensætning: LAS	0,50 g/l
	Talgsæbe	0,05 -
	Alkholethoxylat (C ₁₂₋₁₄ ,6EO)	0,10 -
	Alkholethoxylat (C ₁₆₋₁₈ ,30EO)	0,02 -
	Zeolite	1,20 -
15	Na ₂ CO ₃	0,50 -
	Natriummetasilicat	0,10 -
	EDTA (titriplex III)	0,01 -
	Na ₂ SO ₄	2,00 -
	Temperatur:	30°C
20	Vasketid:	20 minutter
	Lipasedosering:	6000 LU/l
	pH:	9,5
	Besmudsning:	50 μ l olivenolie

<u>Lipasepræparat</u>	<u>n (μ mol)</u>
intet	546
H. lanuginosa	454
H. brevis var. thermoidea	468
5 H. brevispora	484
H. insolens	350

EKSEMPEL 8Stabilitet af Humicola lipase overfor protease

Den udmærkede stabilitet af Humicola lipaser i deter-
10 gentopløsninger indeholdende proteolytiske enzymer vises i
nedenstående.

Et Humicola lanuginosa præparat (DSM 4109) sammen-
lignes med den Fusarium oxysporum lipase, der blev anvendt i de
foregående eksempler og med det kommercielle lipasepræparat,
15 Amano P (Amano Pharmaceutical co. Ltd., Nagoya, Japan), som er
fremstillet af Pseudomonas fluorescens.

De alkaliske Bacillus proteaser ALCALASE®, SAVINASE®
og ESPERASE® anvendtes. Disse er kommercielle detergentproteaser
fra Novo Industri A/S, Danmark.

20 Den proteolytiske aktivitet blev bestemt med kasein
som substratet. En Kasein proteaseenhed (CPU) blev defineret som
mængden af enzym, der frigør 1 mM af primære aminogrupeer
(bestemt ved sammenligning med en serinstandard) pr. minut under
standardbetingelser, dvs inkubation i 30 minutter ved 25°C og pH
25 9,5. En 2% (w/v) opløsning af kasein (Hammersten, solgt af Merck
A.G., Vesttyskland) blev fremstillet med Universalpufferen, der
er beskrevet i Britton og Robinson (Journ.Chem.Soc. 1931, s.
1451) indstillet til pH 9,5.

Detergent: 1,3 g/l af et fosfat-frit pulver indeholdende 25% overfladeaktivt stof (alfa-olefin sulfonate (AOS) og lineær alkylbenzensulfonat (LAS)), natriumsulfat, zeolite, natriumsilicat og optisk hvidt.

Vandets hårdhedsgrad: 4,5°dH
 pH: 10,0 (indstillet)
 Temperatur: 25°C
 10 Lipaseaktivitet (initial): 3000 LU/l
 Proteaseaktivitet: 0 or 0,05 CPU/l
 Resterende lipaseaktivitet (%):

1) Protease: SAVINASE®

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
15 Humicola lanuginosa	100	99	94	91	89
Fusarium oxysporum	100	32	14	3	-
Pseudomonas fluorescens	100	1	0	-	-

2) Protease: Ingen

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
25 Humicola lanuginosa	100	101	99	102	96
Fusarium oxysporum	100	57	42	18	6
Pseudomonas fluorescens	100	94	94	88	90

5	Detergent:	LAS	0,40 g/l
		Alkholethoxylat (Berol 065)	0,15 g/l
		Talgsæbe	0,15 g/l
		Natriumtripolyfosfat	1,50 g/l
		Natriummetasilicat	0,40 g/l
		CMC	0,05 g/l
		Na ₂ SO ₄	2,10 g/l

Vandets hårdhedsgrad: 18°dH

pH: 9,5

10 Temperatur: 30°C

Lipaseaktivitet: 3000 LU/l

Proteaseaktivitet: 0 or 0,05 CPU/l

1) Protease: SAVINASE®

15	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	99	98	97	97
	Fusarium oxysporum	100	5	0	-	-
	Pseudomonas					
20	fluorescens	100	0	-	-	-

2) Protease: ALCALASE®

25	Lipase	Inkubationstid (min)				
		0	15	30	60	90
	Humicola lanuginosa	100	98	97	95	95
	Fusarium oxysporum	100	24	4	0	-
	Pseudomonas					
	fluorescens	100	18	0	-	-

3) Protease: ESPERASE®

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
5 Humicola lanuginosa	100	97	96	96	98
Fusarium oxysporum	100	20	0	-	-
Pseudomonas fluorescens	100	0	-	-	-

4) Protease: Ingen

Lipase	Inkubationstid (min)				
	0	15	30	60	90
10 Humicola lanuginosa	100	96	95	96	94
Fusarium oxysporum	100	30	10	0	-
15 Pseudomonas fluorescens	100	101	102	102	99

Det ses, at Humicola lipasen ifølge opfindelsen er meget stabil i detergentopløsninger med protease i modsætningen til kendte detergentlipaser (Fusarium and Pseudomonas).

20 EKSEMPEL 9

Stabiliseret flydende Humicola lipasepræparat

Lipasestabilitet i opløsninger med forskellige stabiliseringsmidler blev undersøgt.

Lipase: Humicola lanuginosa (DSM 4109)
 25 Lagringstemp: 30°C
 pH: 7,0

Rodalon[®] blev tilsat til alle præparaterne som konserveringsmiddel (0,2 mg aktivt stof per ml).

Resultater:

	1,2-propandiol (ml/ml)	Sorbitol (g/ml)	CaCl ₂ ·2H ₂ O (mg/ml)	INITIAL	Restaktivitet (%),				
				AKTIVITET	dage				
				(LU/ml)	0	2	13	29	49
5									
	1	0	0	4520	100	17	2	<1	<1
10	2	0,50	0	4520	100	93	63	35	34
	3	0,50	3	4720	100	86	76	54	48
	4	0	0,30	4880	100	57	10	<1	<1

Disse resultater viser, at 1.2-propandiol (MPG = mono-propylenglycol) er et udmærket stabiliseringsmiddel for Humicola lipase. Lagerstabiliteten blev yderligere forbedret ved tilsætning af Ca salt. Sorbitol har en svagt stabiliserende virkning.

Et vaskeforsøg blev udført med stabiliseret flydende lipasepræparat med følgende sammensætning:

20	Humicola lanuginosa DSM 4109 lipase	5000 LU/ml
	1.2-propandiol	50% v/v
	Deioniseret vand	50% v/v
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3 mg/ml

25	Detergentsammensætning:	LAS (0,5 g/l), Na ₂ CO ₃ (1,0 g/l)
	Temperatur:	30°C
	Vasketid:	20 minutter
	pH:	9,5
	Besmudsning:	50 µl olivenolie
	Lipasedosering:	1 ml stabiliseret flydende præparat pr. liter vaskeflotte.

Resultater:

	Lipasedosering	Restolie (mg)	n (µmol)
	LU/l		
	0	157	507
5	5000	145	418

EKSEMPEL 10Humicola lipase som støvfrit granulat

En granulatbærer uden enzym blev hovedsageligt fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 4,106,991 med følgende 10 sammensætning:

	15%	cellulosefibre
	4%	titaniumdioxid
	5%	gult dextrin
	10%	saccharose
15	64%	natriumsulfat

Dette granulat blev sigtet for at opnå en partikelstørrelse på 300-710 µm.

30,8 g af dette blev befugtet med 6,2 g af en 30% opløsning i ethanol af polyvinylpyrrolidon (PVP K30, produkt af 20 GAF Corp., USA). Efter grundig blanding blev 12,3 frysetørret H. lanuginosa DSM 4109 lipase (92.700 LU/g, hovedsageligt fremstillet som i eksempel 2) tilsat, og blev grundigt blandet. Granulatet blev tørret (fordampning af ethanol) ved gennemblæsning (fluidisering) ved ca. 50°C. Partikler med partikelstørrelser på 25 300-850 µm blev opsamlet ved sigtning.

Granulatet blev derefter overtrukket i tre trin som følger:

- 5% polyethylenglycol (MW 600)
- 11,25% TiO_2 /Mg silicat (4:1)
- 4% polyethylenglycol (MW 600)

Det overtrukkede granulat blev gennemblæst ved 0,8 5 m/sekund i 10 minutter for at fjerne fine partikler af overtræksmateriale. Endelig blev materialet igen sigtet, og partikler med partikelstørrelser fra 300 til 850 μm blev opsamlet. Et støvfrit, offwhite granulat blev opnået.

Udbytte og aktivitet blev som følger:

10	frysetørret pulver	92.700 LU/g	12,3 g
	uovertrukket granulat	21.100 -	45,0 -
	overtrukket granulat	18.200 -	

Et vaskeforsøg blev udført med det frysetørrede pulver og granulatet som følger:

15	Detergentsammensætning:	LAS (0,5 g/l), Na_2CO_3 (1,0 g/l)
	Temperatur:	30°C
	Vasketid:	20 minutter
	Lipasedosering:	6000 LU/l
	pH:	10,0
20	Besmudsning:	50 μl olivenolie

Resultater:

Lipasepræparat	n (μmol)
intet	515
frysetørret pulver	386
25 granulat	415

PATENTKRAV

1. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten Humicola, inklusive slægten Thermomyces.
2. Enzymatisk additiv ifølge krav 1, kendetegnet ved, at stammen tilhører en thermofil Humicola sp., inklusive thermofil Thermomyces sp.
3. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 2, kendetegnet ved, at stammen tilhører H. lanuginosa (Griffon og Maublanc) Bunce, H. brevispora Subrahmanyam og Thirumalachar, H. brevis var. thermoidea Subrahmanyam og Thirumalacher eller H. insolens Cooney & Emerson.
4. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 3, kendetegnet ved, at stammen er H. lanuginosa DSM 3819.
5. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at lipasen krydsreagerer immunologisk med lipasen fra Humicola lanuginosa stamme DSM 3819.
6. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 til 5, kendetegnet ved, at additivet er tilvejebragt som et ikke-støvende granulat eller en væske.
7. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 6, kendetegnet ved, at additivet er tilvejebragt som en væske indeholdende et enzymstabiliserende middel.

8. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 7, kendetegnet ved, at stabiliseringsmidlet er propylenglycol.
9. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 til 8, kendetegnet ved, at lipaseaktiviteten er over ca. 10.000 LU/g 5 additiv.
10. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 til 9, kendetegnet ved, at additivet udover lipasen indeholder et proteolytisk enzym.
11. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 10, kendetegnet 10 ved, at den proteolytiske aktivitet er mellem ca. 0,5 og ca. 3,0 Ansonenheder/g additiv.
12. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 10 eller 11, kendetegnet ved, at det proteolytiske enzym er en alkalisk Baci' us protease.
- 15 13. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 12, kendetegnet ved, at det proteolytiske enzym er fremstillet mikrobielt ved hjælp af Bacillus licheniformis eller er fremstillet i henhold til US patentskrift nr. 3,723,250.
14. Detergent omfattende et enzymatisk additiv, hvis aktive 20 bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at det enzymatiske detergentadditiv er det enzymatiske additiv ifølge krav 1 til 13.
15. Detergent ifølge krav 14, tilvejebragt som et pulver eller en væske.
- 25 16. Detergent ifølge krav 14 eller 15, kendetegnet ved, at detergentet indeholder det enzymatiske detergentadditiv ifølge krav 1 til 12 i en mængde af mellem 0,1 og 5% w/w.

17. Detergent ifølge krav 14 til 16, **kendetegnet** ved, at det overfladeaktive stof omfatter fra 30 til 100 vægt-% anionisk overfladeaktivt stof og fra 0 til 70 vægt-% non-ionisk overfladeaktivt stof.
- 5 18. Detergent ifølge krav 14 til 17, **kendetegnet** ved, at lipaseaktiviteten er mellem 50 og 20.000 LU/g detergent.
19. Detergent ifølge krav 14 til 18, **kendetegnet** ved, at detergentet omfatter en protease.
20. Detergent ifølge krav 19, **kendetegnet** ved, at protease-
10 aktiviteten er mellem 0,0005 og 0,15 AU/g detergent.
21. Vaskeproces, **kendetegnet** ved, at detergentet er detergentet ifølge krav 14 til 20 og pH er mellem 7 og 12.
22. Vaskeproces ifølge krav 21, **kendetegnet** ved, at vaskeflotten indeholder detergentet ifølge krav 14 til 20 i en
15 mængde af mellem 0,5 og 20 g pr. liter vaskeflotte.

NOVO INDUSTRI A/S

17. DEC. 1987

409/87

PATENTKRAV

1. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, **kendetegnet** ved, at lipasen kan fremstilles ved hjælp af en stamme af slægten Humicola, inklusive slægten Thermomyces.
2. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1, **kendetegnet** ved, at stammen tilhører H. lanuginosa (Griffon og Maublanc) Bunce, H. brevispora Subrahmanyam og Thirumalachar, H. brevis var. thermoidea Subrahmanyam og Thirumalacher eller H. insolens Cooney & Emerson.
3. Enzymatisk detergentadditiv, hvori den aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, **kendetegnet** ved, at lipasen krydsreagerer immunologisk med lipasen fra Humicola lanuginosa stamme DSM 3819.
4. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 3, **kendetegnet** ved, at additivet er tilvejebragt som et ikke-støvende granulat eller en væske.
5. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 1 - 4, **kendetegnet** ved, at additivet udover lipasen indeholder et proteolytisk enzym.
6. Enzymatisk detergentadditiv ifølge krav 5, **kendetegnet** ved, at det proteolytiske enzym er en alkalisk Bacillus protease.

7. Detergent omfattende et enzymatisk additiv, hvis aktive bestanddel er en mikrobielt fremstillet lipase, kendetegnet ved, at det enzymatiske detergentadditiv er det enzymatiske additiv ifølge krav 1 - 6.
- 5 8. Detergent ifølge krav 7, kendetegnet ved, at det overfladeaktive stof omfatter fra 30 til 100 vægt-% anionisk overfladeaktivt stof og fra 0 til 70 vægt-% ikke-ionisk overfladeaktivt stof.
9. Detergent ifølge krav 7 og 8, kendetegnet ved, at
10 detergentet omfatter en protease.
10. Vaskeproces, kendetegnet ved, at detergentet er detergentet ifølge krav 7 til 9 og pH er mellem 7 og 12.

NOVO INDUSTRI A/S